

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 W095/18236 (43) 国際公開日 1995年7月6日(06.07.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02276 (22) 国際出願日 1994年12月27日(27.12.94) (30) 優先権データ 特願平5/338528 1993年12月28日(28.12.93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ダイキン工業株式会社(DAIKIN INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中崎西二丁目4番12号 梅田センタービル Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 木河浩司(KIGAWA, Koji)[JP/JP] 〒567 大阪府茨木市島1-5-28 マンションしま303号 Osaka, (JP) 山中美圭代(YAMANAKA, Mikayo)[JP/JP] 〒591 大阪府堺市長曾根町633 パナハイツ霧島103号 Osaka, (JP) 木原佳代(KIHARA, Kayo)[JP/JP] 〒564 大阪府吹田市朝日が丘町20-5 エルデコート朝日が丘402号 Osaka, (JP) 向井恵吏(MUKAI, Ei)[JP/JP] 〒663 兵庫県西宮市甲子園二番町1-38 Hyogo, (JP)	小幡和哲(OBATA, Kazuaki)[JP/JP] 〒560 大阪府豊中市岡上の町2-5-1033 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku) 〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階 Osaka, (JP) (81) 指定国 AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。	

(54) Title : IN-SITU HYBRIDIZATION METHOD USING RecA PROTEIN AND RecA PROTEIN HAVING MARKER OR LIGAND FOR USE IN SAID METHOD

(54) 発明の名称 RecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法および該方法に使用する標識またはリガンドを有するRecAタンパク質

(57) Abstract

A method for detecting the presence of a target double-stranded nucleic acid sequence in an immobilized cell or cell structure, which method involves the step of immobilizing a cell or a cell structure in such a manner as to permit the invasion by a nucleic acid probe and the step of preparing a probe-RecA composite comprising a single-stranded probe and a RecA protein bonded to each other stably. The presence of a target double-stranded nucleic acid sequence is detected by binding the probe-RecA composite to a target double-stranded nucleic acid sequence through the reaction therebetween under the condition where the target nucleic acid sequence does not undergo denaturation and detecting the RecA protein contained in the composite. The invention method provides a diagnostically important method whereby the position of a specified gene or a regulatory region thereof in a chromosome or the presence of a virus-origin nucleic acid sequence can be determined or visualized readily at a high sensitivity.

(57) 要約

固定された細胞または細胞構造体に含まれる 2 本鎖標的核酸配列の存在を検出する方法が提供される。該方法は、細胞または細胞構造体を、核酸プローブが侵入し得るように固定し、固定された細胞または細胞構造体を得る工程；1 本鎖プローブと RecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を形成する工程を含み、2 本鎖標的核酸配列が変性しない条件下で、上記プローブ・RecA複合体と 2 本鎖標的核酸配列とを反応させて結合し、プローブ・RecA複合体に含まれる RecAタンパク質を検出することにより 2 本鎖標的核酸配列の存在を検出する。

本発明により、染色体中の特定の遺伝子やその調節領域の位置や、ウィルス由来の核酸配列の存在を高感度かつ簡便に測定または視覚化し得る、診断上重要な方法が提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スードアン
AU	オーストラリア	FIR	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	シロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジラント
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チヤード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IIS	アイスランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリー	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴー	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジニール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメールーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	VN	ヴィエトナム
DE	ドイツ	L	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明細書

RecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法および該方法に使用する標識またはリガンドを有するRecAタンパク質

5

技術分野

10

本発明は、細胞または細胞構造体に存在する2本鎖標的核酸配列を検出するのに有用なRecAタンパク質を利用するインシチュハイブリダイゼーション法、該方法の実施に使用するキット、および、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質に関する。

15

背景技術

20

インシチュハイブリダイゼーション法は、細胞内に存在するDNAやRNAなどの標的核酸配列に直接核酸プローブをハイブリダイズさせる方法である。この方法は、透過性を高めた、固定した細胞または細胞構造体（核やミトコンドリア等の器官、細菌やウィルス等の寄生体など）、または固定された染色体標本などの生物材料に適用され、それらに含まれる核酸配列を標的にする。その結果、標的核酸配列の存在を、その存在する場所で、即ち、インシチュに測定し得、標的核酸配列の局在についての情報が得られることから、発生生物学、細胞生物学、遺伝学（とりわけ遺伝子マッピング）、病理学、

遺伝子診断等の生体臨床医学の広い分野に適用可能である。

インシチュハイブリダイゼーション法は、一般に、2本鎖の核酸、代表的には、病原体やウイルスの特定の配列、および、染色体DNAの特定遺伝子を標的にする。従来のインシチュハイブリダイゼーション法では、1本鎖の標識された核酸プローブを使用し、このプローブを透過性を高めた細胞に添加し、2本鎖の標的核酸配列が変性するのに十分な温度に加熱した後、所定の条件下でこのプローブと変性した標的核酸配列とをハイブリダイズさせる。その後、標的核酸配列と結合しなかった未反応のプローブを除去し、細胞中の標的核酸配列に結合したプローブの標識を検出する。

インシチュハイブリダイゼーション法は、染色体DNA上の特定の遺伝子配列の位置や既知の遺伝子との距離のマッピング (Fan, Y. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、6223、1990他)、サテライトDNAやその他の反復配列の染色体上での配置の研究 (杉本憲治ら、臨床分子医学、1、348、1993他)、染色体異常の解析 (Hopman, A. H. N. ら、Histochemistry、89、307、1988他)、DNA損傷部位の解析 (Baan, R. A. ら、Prog. Clin. Biol. Res.、340A、101、1990他) やフローサイトメーターを用いた染色体量の解析 (Trask, B. ら、Hum. Genet.、78、251、1988他)、遺伝子のコピー数の解析 (Kallioniemi, O. P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、89、5321、1992や、Kallioniemi, A. ら、Science、258、818、1992他) 等の染色体DNA研究に広く利用されている。また、宿主染色体に組み込まれたウイルス核酸配列

の局在に関する研究に利用されている (Lawrence, J. B. ら、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、 87、 5420、 1990他)。さらに、断面化した核を3次元的に再構成することによる染色体の位置研究にも使用されている。

5 インシチュハイブリダイゼーション法のその他の一般的な応用例としては、診断手段としての宿主細胞中のウイルスの検出がある (Han, K. H. ら、 J. Virol. Methods. 37, 89, 1992他)。感染細胞中のウイルス粒子の数が非常に少ない場合は、インシチュポリメラーゼチエインリアクション(インシチュPCR)法によってあらかじめウイルス配列を増幅する (Hasse, A. T. ら、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 4971, 1990)。

しかしながら、従来のインシチュハイブリダイゼーション法には種々の制約がある。例えば、2本鎖標的核酸配列を変性させる必要がある。この変性は、通常、標的核酸配列または該核酸配列を含む試料を、特定の薬剤存在下または非存在下で加熱処理することにより行われる。この加熱処理は、しばしば、試料中の核酸に予期できない変化を生じさせる。この変化は、DNAの構造的変化、反復配列を介した核酸間のランダムな再結合などを含む。さらに、変性操作は余分の時間や労力を必要とする。

あるいは、標的核酸配列のコピー数が極めて少ない場合には、長いハイブリダイゼーション時間が必要で、プローブと標的核酸配列とのハイブリダイゼーションが効率良く起こらない。このような場合、あらかじめ標的核酸配列をインシチ

ュPCR法で増幅することによりある程度解消し得る。しかし、インシチュPCR法は繁雑であり、染色体DNA配列の局在の解析に関する研究には不適切である。

上記の制約を解決して、標的核酸配列を変性せずに、少な
5 いコピー数の標的配列を高精度で検出できる方法として、Za
rling, D. A. らによる W093/05177 に記載された、RecAタンパク
質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法が開発され
た。この方法は、標的核酸配列に相補的な配列を有する、標
識またはリガンドを有する 1 本鎖核酸プローブと、RecAタン
10 パク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体を使用し、
標的核酸配列が変性しない条件下で、この複合体と標的核酸
配列をハイブリダイスさせ、標的核酸配列と結合した、標識
またはリガンドを有するプローブを検出することによって、
該標的配列を検出する。この方法では、使用される核酸プロ
15 ブーブが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識等の検
出可能な標識、または、ビオチンやジゴキシゲニンなどそれ
らに特異的なリポーター分子と結合し得るようなリガンドを
有する。

20 化学発光剤、酵素標識などの標識、およびビオチンやジゴ
キシゲニンなどのリガンドを有するプローブを使用する場合
は、RecAタンパク質が結合した該プローブを、標的核酸配列
が変性しない条件下で、2 本鎖の標的核酸配列と結合させ、
未反応のプローブを除去した後に、化学発光工程、酵素反応
工程、または、標識付アビジン、ストレプトアビジンまたは

抗ジゴキシゲニン抗体などのリポーター分子との反応などを含む2次反応により標的核酸配列を検出する。蛍光剤を使用する場合は、共焦点レーザー顕微鏡などきわめて高感度の検出機器を用いて標的核酸配列を検出する。Zarlingらの方法では、標識またはリガンドを有しないプローブは使用できない。

標識またはリガンドを有するプローブを調製するためには、ニックトランスレーション法やランダムプライミング法など公知の方法が用いられる。しかし、これら方法により、プローブに取り込み得る標識またはリガンドの数は、数10～数100塩基に約1つであり、プローブに取り込み得る標識またはリガンド量には限界があった。従って、得られるシグナルの強さは必ずしも十分ではなく、例えば、通常の蛍光顕微鏡を使用して検出する場合、プロピジウムイオダイドなどでカウンター染色を施した場合、單一コピーの遺伝子はほとんど検出できない。また、プローブに取り込まれた標識またはリガンドにより、プローブと標的核酸配列とのハイブリダイゼーション反応が阻害される場合は、検出感度がさらに低下する。さらに、複数の異なる標的核酸配列を同時に検出する場合は、あらかじめそれぞれの標的核酸配列に相補的な各プローブに、異なるタイプの標識もしくはリガンドを結合させる必要があった。

発明の開示

本発明は、上記従来の課題を解決するものであり、その目

的とするところは、RecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を用い、2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質を検出することにより該標的核酸配列の存在を検出することを特徴とする、
5 高感度で簡便なインシチュハイブリダイゼーション法を提供することにある。

本発明者らは、上記のZarlingらの方法に従って得られた、
標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体中に、RecAタ
ンパク質が安定に保持されていることを見いだした。RecAタ
ンパク質がプローブに結合した状態では、例えば、標的核酸
配列を、プローブに結合したビオチンやジゴキシゲニン等そ
れらに特異的なリポーター分子と結合し得るようなリガンド
で検出する場合、前記リポーター分子とリガンドの反応効率
が低下し、蛍光顕微鏡など通常の検出手段では検出感度が低
下すると考えられる。本発明者らは、このような観点から、
10 タンパク質分解酵素や界面活性剤など種々の洗浄液を用い
て、2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体中
のRecAタンパク質を除去しようと試みた。しかし、該複合体
中のRecAタンパク質を標的核酸配列および上記複合体に影響
15 を及ぼすことなくRecAタンパク質を除去し得なかった。そこで、
プローブ・RecA複合体に含まれる標識またはリガンドを有する
プローブを検出するかわりに上記複合体に含まれるRe
cAタンパク質を検出することを考えた。

そして次に発明者らは、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、

放射性標識などの検出可能な標識、またはビオチンやジゴキシゲニン等それらに特異的なリポーター分子と結合し得るようなりガンドを有するRecAタンパク質を調製した。このような標識またはリガンドを有するRecAタンパク質を用いた場合でも、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体（2本鎖標的核酸配列・プローブ・RecA複合体）を効率よく形成させることができ、かつ該複合体に含まれる標識またはリガンドを有するRecAタンパク質を検出することにより、より高感度にかつ簡便に特異性高く該標的核酸配列の存在を検出できることを見いだした。

また、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体（2本鎖標的核酸配列・プローブ・RecA複合体）に、抗RecA抗体を反応させて、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体（2本鎖標的核酸配列・プローブ・RecA複合体）に含まれるRecAタンパク質を検出することにより、該標的核酸配列の存在を検出することも可能であることを見いだして、本発明を完成するに至った。

本発明は、固定された細胞または細胞構造体に含まれる2本鎖標的核酸配列の存在を検出する方法に関し、該方法は以下の工程を包含する：細胞または細胞構造体を、核酸プローブが侵入し得るように固定し、固定された細胞または細胞構造体を得る工程、ここで、該細胞または細胞構造体は、該細胞または細胞構造体に含まれるその構成成分および核酸構造とともに、本来の形態学的な関係を保持している；1本鎖

プローブとRecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を形成する工程、ここで、該1本鎖プローブは該2本鎖標的核酸配列に相補的な配列を有する；該プローブ・RecA複合体を、該固定された細胞または細胞構造体に、該2本鎖標的核酸配列と接触し得る条件下で添加する工程；該2本鎖標的核酸配列が変性しない条件下で、該プローブ・RecA複合体と該2本鎖標的核酸配列とを反応させて結合する工程；該2本鎖標的核酸配列と結合しなかったプローブ・RecA複合体を除去する工程；および該2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質を検出し、それによって該2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程。

発明を実施するための最良の形態

本明細書で使用する用語「細胞」は、動物細胞、植物細胞などの真核細胞、細菌などの原核細胞などを包含し、また、例えば、動物細胞において、精子、卵子などの生殖細胞、体細胞など、形態学的および構造的に異なる任意の種類の細胞を包含する。さらに、これら細胞を含む動植物組織サンプルをも包含する。

本明細書で使用する用語「細胞構造体」は、前記細胞内に存在する、細菌、ウィルス、または核やミトコンドリアなどの器官、染色体、あるいは、ウィルス、細菌などの血液サンプルなどの生体由来の試料に存在する寄生体を包含する。

前記細胞または細胞構造体に含まれる、標的となる2本鎖

核酸配列は、代表的には、染色体DNA、ウィルス、および、前記寄生体の中で病原体となるまたは病原に関連する2本鎖核酸である。

前記の細胞または細胞構造体は、例えば、培養細胞、動植物組織、生物体液などの生物材料から得られ得る。

前記固定された細胞または細胞構造体を得る工程は、従来のインシチュハイブリダイゼーション法において用いられている方法と同様の方法で実施され得る。簡単に言えば、細胞または細胞構造体は、該細胞または細胞構造体に含まれるその構成成分および核酸構造とともに、本来の形態学的な関係を保持しながら有機溶媒、酸または架橋剤などにより固定され、該細胞または細胞構造体の、標的配列に相補的な配列を有するプローブに対する透過性が増加する。一般的な固定剤としては、酢酸、各種塩類、メタノール、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなどが使用され得る。

前記の細胞または細胞構造体は、一般的には、1種または複数の薬剤の存在下または非存在下で処理され、タンパク質および/または脂質を除去し得る。該薬剤は、酸、アルコール、界面活性剤、およびこれらの組み合せを包含し、該処理は、プロテアーゼ、リバーゼなどによる酵素処理、熱処理、洗浄処理、および、これらの処理の組み合わせを包含する。代表的な処理方法としては、メタノール：酢酸で1回または数回洗浄することが知られている。

前記細胞が動物組織の場合は、該動物組織は、ホルマリン、

グルタルアルデヒドなどの従来の固定法により固定された後に、ろうに埋め込み、または、凍結した後、切片にし、透過性を増すために、スライドガラス等の固体支持体上でメタノール：酢酸などで処理され固定され得る。

5 前記細胞構造体は、標的遺伝子配列の細胞内局在を決定したり、細胞内のウイルス、細菌や寄生体等の感染生物の存在及び／または局在を検出するのに使用され得る。核やミトコンドリアなどの細胞構造体は、等密度遠心法のような一般的な分画法によって濃縮され、そして十分に精製した状態で調製され得る。その後濃縮された調製物を前記のように固定して透過性を増すような処理をして、溶液中で、またはスライドガラス等の固体支持体上に固着され、乾燥させて使用し得る。

15 核などの細胞構造体は、細胞を75mMのKCl溶液で前処理した後、メタノール：酢酸処理によって細胞質を取り除いて調製され得る。すなわち、細胞を低速で遠心分離することにより集めた後、75mMのKCl溶液に懸濁し、核が適度に膨張するまで5分～20分間放置してから氷冷したメタノール：酢酸を加えて遠心する。氷冷したメタノール：酢酸を加えて細胞をゆるやかに攪拌して遠心する操作を繰り返して、核から細胞質を除去し得る。このようにして単離された核はメタノール：酢酸に再懸濁し、その内の約10μlをスライドガラスなどの固体支持体の上に滴下して乾燥し固着され得る。固定された核は、室温～-80°Cで保存し得る。あるいは、上記集めた細胞

5 は、リン酸緩衝溶液(PBS)を用いて洗浄後、100%メタノールまたは70%エタノールで処理することにより固定し得、固定された細胞は-20°Cで保存し得る。この保存された固定細胞は、細胞懸濁液の状態で、溶液中でのハイブリダイゼーション反応に使用され得る。

10 染色体などの細胞構造体は、Trask, B. J. ら、Methods in Cell Biology, 35, 16, 1991に記載の通常の方法で、例えば、リンパ球の中期細胞から得られ、この染色体は、通常メタノール：酢酸で処理された後にスライドガラス等の上に滴下され、乾燥して固着され得る。

15 ミトコンドリア、ウイルス粒子など、細胞および血液サンプルから単離された細胞構造体もまた、常法により、前記同様に固定され得る。

20 本発明の方法に用いられる前記核酸プローブは、1本鎖の核酸であり、通常は、1本鎖のDNAである。標的核酸配列の一方または両方の鎖に相補的な2本鎖プローブを変性することによっても調製し得る。市販されている種々のサテライトDNA配列など、多くの1本鎖または2本鎖プローブを本発明に使用し得る。あるいは、当該技術分野で公知のプローブ調製法により、例えば、ウイルス、特異的な配列を有するプラスミドやコスミドまたはその他のベクターから直接調製され得る。必要に応じて、ベクターからプローブDNA部分を制限酵素で切り出し、電気泳動によって特異的な制限酵素断片を単離することにより調製され得る。このようにして得られたプローブ

は通常 2 本鎖の状態であるが、必要に応じて M13 ファージベクターのような 1 本鎖ベクターにサブクローニングされ得る。あるいは、オリゴヌクレオチド合成法によって 1 本鎖プローブを調製し得る。長いプローブを調製する場合は、プローブのサブフラグメントを合成した後、それらのサブフラグメントをつなぎ合わせて調製され得る。
5

前記核酸プローブは、標的核酸配列とプローブとの間の配列特異的なハイブリダイゼーション反応を確実に実施するために、好適には、標的核酸配列と少なくとも 90~95% のホモロジーを持つ核酸配列を有する。この 1 本鎖プローブの長さは、通常、約 100~1,500 塩基であり得、より短い、またより長いポリヌクレオチドプローブも使用され得る。
10

本発明に使用される前記核酸プローブは、標準的な条件では 300ng 以下で使用され、好ましくは 5~100ng の量で使用され得る。
15

前記核酸プローブは、標識またはリガンドを有する必要はないが、必要に応じて、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識などの検出可能な標識や、ビオチンやジゴキシゲニンなど、それらに特異的なリポーター分子と結合し得るリガンドを有し得る。この標識またはリガンドを有するプローブを、検出可能な標識またはリガンドを有する、RecAタンパク質、抗 RecA 抗体、または抗 RecA 抗体に結合し得る 2 次抗体と組み合わせて用いることにより標識またはリガンドのシグナルを増幅し得る。
20

本明細書で使用する用語「RecAタンパク質」は、大腸菌RecAタンパク質の機能のすべてを、またはその機能の大部分を有する、大腸菌RecAタンパク質と実質的に同等のRecA様組換えタンパク質の一群を指し、例えば、大腸菌RecAタンパク質 (Shibata, T. ら、Methods in Enzymology, 100, 197, 1983)、その類似タンパク質であるT4ファージ由来のuvsXタンパク質 (Yonesaki, T. ら、Eur. J. Biochem., 148, 127, 1985)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来のRecタンパク質 (Lovett, C. M. ら、J. Biol. Chem., 260, 3305, 1985)、黒穂菌 (*Ustilago*) 由来のRec1タンパク質 (Kmiec, E. B. ら、Cell, 29, 367, 1982)、酵母、マウス、ヒト由来のRecA様タンパク質 (Shinohara, A. ら、Nature Genetics, 4, 239, 1993)、*Thermus aquaticus* (Angov, E. ら、J. Bacteriol., 176, 1405, 1994) や *Thermus thermophilus* (Kato, R. ら、J. Biochem., 114, 926, 1993) 等の高温菌由来の耐熱性RecA様タンパク質などを包含する。これらの中で、最もよく機能が研究されているのは大腸菌由来のRecAタンパク質である。大腸菌由来のRecAタンパク質としては、その野生型のみならず多くの変異型（例えばRecA803 : Madiraju, M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 6592, 1988 や RecA441 : Kawashima, H. ら、Mol. Gen. Genet., 193, 288, 1984）も使用し得る。

RecAタンパク質は、常法（例えば、Shibata, T. ら、Methods in Enzymology, 100, 197, 1983）により大腸菌から精製して使用し得る。または、市販のRecAタンパク質（例えばファ

ルマシア社製)を使用し得る。

前記RecAタンパク質は、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンなどの検出可能な標識またはリガンドを有し得る。蛍光剤として、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル(Cy3TM、Cy5TMなど)、ローダミン、テキサスレッド(スルフォローダミン)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸などを使用し得る。酵素標識としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼなどを使用し得る。

前記標識またはリガンドを有するRecAタンパク質の調製は、抗体などのタンパク質に標識あるいはリガンドを結合させる方法に準じて実施し得る。例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)やテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)などの蛍光剤(蛍光色素)は、松橋ら、生物化学実験法15「免疫学実験入門」、137ページ(学会出版センター)の方法に準じて前記RecAタンパク質に結合され得る。また、Cy3TMやCy5TM等のカルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル類の蛍光剤は、例えば、Southwickらの方法(Southwick, P. L. ら、Cytometry, 11, 418, 1990)に準じてRecAタンパク質に結合され得る。あるいは、FluoroLink-AbTM "Cy3TM Labeling Kit"やFluoroLink-AbTM "Cy5TM Labeling Kit" (BIOLOGICAL DETECTION SYSTEMS, INC. 製)などの市販のキ

ットを用いて結合され得る。前記RecAタンパク質に結合する前記蛍光剤の量は、RecAタンパク質モノマーあたり1~10分子、好ましくは1~6分子である。

アクリジニウムエステル等の化学発光剤は、例えば、Simpson, J. S. A. らの方法。(Simpson, J. S. A. ら、 Bioluminescence and Chemiluminescence. Basic Chemistry and Analytical Applications. New York: Academic Press 1981、673ページ)に準じて前記RecAに結合され得る。

アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどの酵素標識は、例えば、松橋ら、生物化学実験法15「免疫学実験入門」、151ページ(学会出版センター)の方法に準じて前記RecAタンパク質に結合され得る。RecAタンパク質に結合する酵素標識の数量は、RecAタンパク質モノマーあたり1~3分子、好ましくは1~2分子である。

15 125 I や 131 I 等の放射性標識は、例えば、松橋らの生物化学実験法15「免疫学実験入門」、143ページ(学会出版センター)の方法に準じて前記RecAタンパク質に結合され得る。あるいは、種々の放射性標識を有するアミノ酸存在下で培養した大腸菌から精製することにより、放射性標識を有するRecAタンパク質を調製し得る。

ビオチン化RecAタンパク質は、例えば、生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」、24ページ(東京化学同人)の方法に準じて調製され得る。前記RecAタンパク質に結合するビオチンの量は、RecAタンパク質モノマーあたり1~10分子、

好ましくは1~6分子である。

ジゴキシゲニン化RecAタンパク質は、ジゴキシゲニン-3-O-
-サクシニル-ε-アミノカブロン酸-N-ヒドロキシ-サクシイミ
ドエステル(DiG-NHS)等を用いて定法(ベーリンガーマンハイ
ム社製のキット)によって調製され得る。前記RecAタンパク質
に結合するジゴキシゲニンの量は、RecAタンパク質モノマー
あたり1~10分子、好ましくは1~6分子である。

前記の標識またはリガンドを有するRecAタンパク質は、標
識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質と混合し
て使用され得る。

前記プローブ・RecA複合体を形成する工程は、Zarlingらに
によるWO93/05177、およびWO93/05178の記載に準じて実施され
得る。好ましくは、ATP γ S、GTP γ S、rATP、rATP再生系(ベ
ーリンガーマンハイム社製)存在下のrATP、dATP、ATP γ Sと
rATPとの混合物、ATP γ SとADPとの混合物、GTP γ SとADPとの
混合物、GTP γ SとGDPとの混合物などのコファクターの存在下
で実施され得る。好ましいコファクターは、ATP γ S、rATPま
たはGTP γ Sである。前記コファクターは、約0.12~12.0mM、
好ましくは0.24~7.0mMの濃度範囲で使用され得る。

前記プローブ・RecA複合体の調製に用いるプローブは、1
本鎖または2本鎖いずれの形態でも使用され得、代表的には、
約95~100°Cの温度範囲で約5分間熱変性し、約20秒から1分
間氷冷した後、前記RecAタンパク質との結合反応に使用され
得る。必要に応じて、RecAタンパク質との結合反応前に約20

秒間0~4°Cで遠心される。変性されたプローブは-20°Cのフリーザーで保存し得るが、好ましくは、氷水中で直ちに前記コファクターを含む標準的なRecA反応溶液 (Ferrin, L. J. ら、*Science*, 254, 1494, 1991やSena, E. P. ら、*Nature Genetics*, 3, 365, 1993等) および前記RecAタンパク質と混合する。この混合液を37°Cで10~15分間保温することによって、1本鎖プローブにRecAタンパク質を安定に結合させる。この反応で1本鎖プローブの約3塩基に対し、RecAタンパク質が1分子の割合で結合し、1本鎖プローブがRecAタンパク質でコートされる。

前記プローブと反応させるRecAタンパク質の濃度は、プローブの大きさや量によって変化し得、好ましくは約0.5~100μMの範囲である。RecAタンパク質(モノマー)とプローブ中の塩基との混合比率は、約5:1~1:3の範囲で、好ましくは、3:1~1:2.5の範囲で結合反応を実施し得る。前記プローブ・RecA複合体形成反応は、必要に応じて、single-strand binding protein(SSB)、バクテリオファージT4遺伝子32タンパク質(T4 gene32 protein)などのタンパク質の共存下で実施し得、それによって反応を促進し得る。

プローブに結合しなかった遊離のRecAタンパク質の影響を除去するために、例えば、サケ精子DNA、酵母または大腸菌由来のtRNAなどのキャリアーDNAまたはRNAをプローブ・RecA複合体形成後に加えて、プローブに結合しなかった遊離のRecAタンパク質をこのキャリアーに結合させ、固定された上記細

胞または細胞構造体に含まれる標的核酸配列以外の核酸等へのRecAタンパク質の非特異的な結合を防ぎ得る。この処理は、蛍光顕微鏡観察などのバックグラウンドのノイズシグナル減少に有用である。あるいは、通常のカラムクロマトで遊離の5 RecAタンパク質と前記プローブ・RecA複合体を分離して遊離のRecAタンパク質を除去し得る。検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質を使用してプローブ・RecA複合体を調製する場合は、前記のキャリアーDNAまたはRNAを用いる後処理が有効である。

10 また、プローブ・RecA複合体の調製に用いるプローブとRecAタンパク質の比率を調節することによりこの工程を省略することも可能である。

あるいは、前記の検出可能な標識またはリガンドを有する15 プローブ・RecA複合体は、標識またはリガンドを有さないRecAタンパク質を、1本鎖プローブに安定に結合した後、前記の方法に従って、検出可能な標識またはリガンドを、プローブ・RecA複合体中のRecAタンパク質に結合することにより調製し得る。

前記プローブ・RecA複合体を、固定された細胞または細胞構造体に、前記2本鎖標的核酸配列と接触し得る条件下で添加する工程、および、前記プローブ・RecA複合体と2本鎖標的核酸配列とを反応させて結合する工程は、前記Zarlingらの記載に準じて実施し得る。すなわち、該標的核酸配列が変性しない条件、例えば、2本鎖DNAの変性がおこる温度以下で、

前記プローブ・RecA複合体を標的核酸配列を含む細胞または細胞構造体に添加し、2本鎖の標的核酸配列と、プローブ・RecA複合体とを塩基配列特異的なハイブリダイゼーション反応により結合させる。

5 前記ハイブリダイゼーション反応は、該プローブ・RecA複合体と標的核酸配列との相同部位で結合がおこるまで、約1～24時間、好ましくは2～18時間、37°Cに保持することにより実施され得る。前記ハイブリダイゼーション反応は、必要に応じて、single-strand binding protein(SSB)、トポイソメラーゼIやトポイソメラーゼIIなどのタンパク質の共存下で実施し得、それによって反応を促進し得る。標的核酸配列に結合しなかったプローブ・RecA複合体は、公知の洗浄方法により除去し得る。但し、例えば、タンパク質分解酵素や、RecAタンパク質を可溶化する界面活性剤を高濃度に含む洗浄液の使用は望ましくない。

10

15

前記のハイブリダイゼーション反応を行う前に、必要に応じて、前記固定された細胞または細胞構造体は、前記プローブ・RecA複合体を添加する工程に先だって、10mMのトリス酢酸緩衝液(pH 7.5)中で、4～60°Cで処理したり、ペプシンやproteinaseK等のタンパク質分解酵素で処理することにより、ハイブリダイゼーション反応の反応効率を高め得る。また、標的核酸配列を含む細胞または細胞構造体をRNA分解酵素、nuclease(DNaseI等)やリガーゼにより処理しておいてもよい。

20

あるいは、必要に応じて、ハイブリダイゼーション反応を

行う前に、前記固定された細胞または細胞構造体を、カゼイ
ン、スキムミルク、および、牛血清アルブミン、キャリアー
DNA、および、キャリアーRNAからなる群から選ばれる少なく
とも一種を含む、前処理用ブロッキング液で処理し得る。前
5 処理用ブロッキング液に含まれるこれらの物質は、RecAタン
パク質に結合している標識またはリガンド、および／または
RecAタンパク質それが自身が、固定した細胞または細胞構造体、
および／または固体支持体に非特異的に結合するのを防止す
る。また、FITC、TRITCやCy3™、Cy5™などのカルボキシメチ
10 ルインドシアニンサクシニミジルエステル類などの蛍光剤を
有するRecAタンパク質を使用する場合には、標識またはリガ
ンドを有しない通常のRecAタンパク質を前処理用ブロッキン
グ液に添加しておいてもよい。この処理は、代表的には、前
記前処理用ブロッキング液を前記固定された細胞または細胞
構造体に添加することにより実施され得る。

前記固定された細胞または細胞構造体は、懸濁液の状態で、
前記プローブ・RecA複合体とハイブリダイゼーション反応さ
せ得る。すなわち、プローブ・RecA複合体を含むハイブリダ
イゼーション反応溶液に、固定された細胞または細胞構造体
20 を懸濁させて1～24時間、好ましくは2～18時間、例えば、37
℃に保持することにより実施し得る。反応後、洗浄液に細胞
を懸濁させ、洗浄して未反応のプローブ・RecA複合体を除去
する。

スライドガラス等の固体支持体上に固着された細胞または

細胞構造体と前記プローブ・RecA複合体とを反応する場合は、通常、約10～20μlのプローブ・RecA複合体を含む反応溶液を、スライドガラス上の固着させた前記細胞または細胞構造体に添加して実施し得る。得られた反応溶液にカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて、例えば、37℃で約1～24時間、好ましくは2～18時間ハイブリダイズさせる。反応後、数回洗浄して未反応のプローブ・RecA複合体を取り除く。

前記のハイブリダイゼーションに用いる反応溶液は、代表的には、反応溶液中の各構成成分の最終濃度が、以下の範囲になるように調製し得る；1～100mMトリス酢酸緩衝液、2～20mM酢酸マグネシウム、0～100mM酢酸ナトリウム、0.4～1mMジチオスレイトール、0～100mM EGTA、0～50mMスペルミジン、0～10%グリセロール、0.24～7.0mM ATP γ S、rATPまたはGTP γ S、0.5～160μM RecAタンパク質（標識またはリガンドを有するRecAタンパク質のみ、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質および通常のRecAタンパク質との混合物、あるいは標識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質のみ）、1反応あたり5～100ngのプローブ、1反応あたり0～10μgキャリアーDNAもしくはRNA）。

前記2本鎖標的配列の存在を検出する工程は、例えば、FITC、TRITCやCy3TM、Cy5TM等のカルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル類等の蛍光剤を有するRecAタンパク質を検出する場合は、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるこれら蛍光標識を有する

RecAタンパク質由来の蛍光シグナルを、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーター (FACS=fluorescence activated cell sorter)で検出することにより実施し得る。

5 アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたはβ-ガラクトシダーゼなどの酵素標識を有するRecAタンパク質を検出する場合は、公知の方法、例えば、特公表平4-505556号に記載の方法により、ニトルブルーテトラゾリウムや5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートなどの不溶性色素を生産する発色性の基質、AMPPD(TROPIX社製)などの化学発光性の基質を用いて実施し得る。
10

放射性標識を有するRecAタンパク質を検出する場合は、公知の方法、例えば、吉田廸弘、蛋白質核酸酵素、38、558、1993に記載の、オートラジオグラフィーを行うことにより実施し得る。

15 ピオチンやジゴキシゲニンなどのリガンドを有するRecAタンパク質を検出するには、FITC-アビジンなどのような、検出可能な標識を有するアビジン／ストレプトアビジン、および、抗ジゴキシゲニン抗体と結合することにより実施し得る。

あるいは、前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程は、プローブ・RecA複合体に、標識またはリカンドを有する、または、有しない抗RecA抗体を反応させて検出し得る。標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を使用する場合は、標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質と、検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA

抗体を反応させた後、未反応の抗RecA抗体を除去してから、前記の標識またはリガンドの検出方法に準じて、RecAタンパク質に結合した標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を検出することにより、該標的配列を検出し得る。

5 抗RecAポリクローナル抗体は、例えば、松橋らの生物化学実験法15「免疫学実験入門」など、常法により、容易に調製し得る。そして、抗RecAモノクローナル抗体は、例えば、牧野らの方法 (Makinoら、J. Biol. Chem.、260、15402、1985)により調製し得る。検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体の調製は、前記の検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質の調製法と同様の方法で調製し得る。
10 15

あるいは、前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程は、抗RecA抗体および抗RecA抗体と結合し得る2次抗体を用いて行われ得る。該2次抗体は、検出可能な標識またはリガンドを有し得る。抗RecA抗体を認識して結合できる2次抗体としては、例えば、抗RecA抗体がマウス由来である場合は、抗マウスIgG抗体を使用し得、抗RecA抗体がウサギ由来である場合は、抗ウサギIgG抗体を使用し得、抗RecA抗体がヤギ由来である場合は、抗ヤギIgG抗体などを使用し得、通常は、市販の標識抗血清 (例えば、FITC標識抗マウスIgG抗体やFITC標識抗ウサギIgG抗体等) を使用し得る。これらの抗RecA抗体を認識して抗RecA抗体に結合し得る、検出可能な標識またはリガンドを有する2次抗体の調製は、前記の検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質の調製法と同様の方法で

調製し得る。

また、上記の検出方法を組み合せ、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質、標識またはリガンドを有する抗RecA抗体、および、抗RecA抗体と結合可能な標識またはリガンドを有する2次抗体を組み合わせて使用することにより、シグナルを従来法よりもはるかに強く増幅することが可能である。

5 本発明は、また、別の局面で、前記方法を実施するための、検出可能な標識またはリガンドを有するRecA抗体を含むキットを提供する。

10 本発明はまた、前記方法を実施するための、プローブと検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体を含むキットを提供する。

本発明はまた、前記方法を実施するための、RecAタンパク質および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含むキットを提供する。

15 本発明はまた、前記方法を実施するための、プローブとRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体、および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含むキットを提供する。

20 本発明によるキットは、以下の試薬を包含し得る：(1)例えば、75mM KCl、酢酸などを含む70～100%のアルコール溶液からなる、細胞または細胞構造体固定用試薬；(2)例えば、0～0.5% TritonX-100、0.1～10%スキムミルク、カゼイン、牛血清アルブミン、0～5mg/mlキャリアーDNAおよび／またはRNA、

0～10mg/mlの標識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質などを含む10～100mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)からなる前処理用ブロッキング液；(3)例えば、0～15mM酢酸マグネシウム、0～50mM酢酸ナトリウム、0～1mMジチオスレイトール、0～100mM EGTA[エチレングリコールーピス(β-アミノエチルエーテル)N,N,N',N'-4酢酸]、0～50mMスペルミジンなどを含む10～100mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)からなる、細胞処理液；(4)例えば、使用時に以下のようないくつかの組成の反応溶液を調製するために希釈されるべき濃厚な保存反応溶液；2～20mM酢酸マグネシウム、0～100mM酢酸ナトリウム、0.4～1mMジチオスレイトール、0～100mM EGTA、0～10%グリセロール、0～50mMスペルミジン、0.24～7.0mM ATP γ SもしくはGTP γ Sを含む、10～100mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)；(5)例えば、0.1～40 μ g/ μ lのRecAタンパク質溶液。ここで、RecAタンパク質は、標識またはリガンドを有したまたは有さず、あるいは、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質と有さないRecAタンパク質との混合物である；(6)例えば、5～100ng/ μ lの濃度の1本鎖または2本鎖のプローブを含むプローブ溶液。プローブの例として各染色体特有の α サテライトDNA配列由来、ガン遺伝子配列由来、ガン抑制遺伝子配列由来やウイルス遺伝子配列由来のプローブなどが考えられる；(7)例えば、約0.01～5mg/ml濃度のサケ精子DNAおよび/または大腸菌や酵母由来のtRNAを含む、キャリアーDNAまたはRNA溶液；(8)例えば、以下の組成を有するプローブ・RecA複合体溶液；0.5～5

00ng/ μ lの1本鎖プローブ、0.01~200 μ g/ μ lの標識またはリガンドを有するRecAタンパク質および/または通常のRecAタンパク質、2~75mM酢酸マグネシウム、0~1.0M酢酸ナトリウム、0.4~5mMジチオスレイトール、0~1.0M EGTA、0~500mMスペルミジン、0~50%グリセロール、0.24~70mM ATP γ SまたはGTP γ Sを含む0.01~1Mトリス酢酸緩衝液(pH7.5)。この液は、あらかじめ1本鎖DNAに、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質および/または通常のRecAタンパク質を安定に結合したプローブ・RecA複合体を含む溶液で、前記(4)(5)(6)および必要に応じて(7)を混合して調製する；(9)例えば、10~1000 μ g/mlの濃度の、標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含む、抗RecA抗体溶液；(10)例えば、0~1000 μ g/mlの濃度の、標識またはリガンドを有し、そして抗RecA抗体と結合し得る2次抗体を含む2次抗体溶液；(11)希釈して使用される濃厚な保存洗浄液；(12)例えば、0.1~10%スキムミルク、カゼイン、牛血清アルブミン、4×SSC(20×SSC:3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム、pH7.5を希釈した液)、0~0.5%TritonX-100などを含む、抗体反応の前処理用ブロッキング液；(13)RecAタンパク質または抗RecA抗体に結合したリガンドや酵素等と反応する、検出可能なりポーターシステム；(14)例えば、100mgのp-フェニレンジアミンジヒドロクロリドを10mlのPBSに溶解した後、pH9の0.5M carbonate-bicarbonate bufferでpH8に調製し、90mlのグリセロールを加えてから0.22 μ mのフィルターで滙過して得た、蛍光剤の退色を防

ぐ抗退色試薬溶液。必要に応じてプロピディウムイオダイド(PI)や4',6-ジアミディノ-2-フェニルインドール(DAPI)などのカウンター染色剤を含有し得る。

本発明は、また、別の局面で、前記の方法に使用し得る、
5 標識またはリガンドを有するRecAタンパク質を提供する。該
RecAタンパク質は、好ましくは、フルオレセインイソチオシ
アネート、Cy3TM、Cy5TMなどのカルボキシメチルインドシア
ニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド
(スルフォローダミン)、テトラメチルローダミンイソチオ
シアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸か
らなる群から選択される蛍光剤を、RecAタンパク質モノマー
あたり1~6分子を含み、または、アルカリホスファターゼ、
ペルオキシダーゼまたはβ-ガラクトシダーゼからなる群か
ら選択される酵素標識を、RecAタンパク質モノマーあたり1~
10 3分子含み、または、ビオチン、ジゴキシゲニンの群から選択
されるリガンドを、RecAタンパク質モノマーあたり1~6分子
含む。

本発明により、染色体中の、特定の遺伝子やその調節領域
の位置や、ウィルス由来の核酸配列の存在をシグナル増幅な
20 しで高感度にかつ簡便に測定または視覚化し得る、診断上重
要な方法が提供される。

本発明により、p53のようなガン抑制遺伝子等の單一コピー
遺伝子を、高感度で簡便に検出できる。さらに、本発明の方
法は、Kallioniemi, A. らによって開発されたCGH法 (compara

tive genomic hybridization 法) (Kallioniemi, A. ら、 *Science*, 258, 818, 1992) にも適用し得る。

本発明の方法は、以下の遺伝子および配列を標的とし得る
5 : (1)特定の有用な遺伝子産物をコードする遺伝子；(2)例え
ば、リボゾーム遺伝子、ガン遺伝子、ガン抑制遺伝子など、
重要な細胞制御機能を果たしている遺伝子；(3)反復配列
およびそれに関連する配列；(4)活性遺伝子産物の発現を阻害
する遺伝子の欠陥；(5)既知の遺伝子マップ位置にあるマーカー¹⁰
プローブ領域と関連する遺伝子または配列；(6)B型肝炎ウ
イルスなどの、クロマチンに組み込まれたウイルス遺伝子配
列およびウイルス粒子中のウィルス遺伝子配列。

さらに、本発明の方法は、染色体の倍数性の変化や欠失、
挿入、転座、逆位、重複や増幅等の多様な染色体異常の検出
に使用し得る。例えば、特定の領域に相補的なプローブとFI
15 TC標識を有するRecAタンパク質とを安定に結合させたプロー
ブ・RecA複合体、および、別の領域に相補的なプローブとTR
ITC標識とを有するRecAタンパク質を安定に結合したプローブ
・RecA複合体を用いて、同時にハイブリダイゼーション反応
を行うことにより、それぞれの領域を蛍光顕微鏡を用いて適
20 切な励起波長で検出し得る。即ち、2種類の識別可能な蛍光
シグナルの位置から、染色体中の2つの異なる遺伝子領域の
相対的な方向と距離を判定することによって遺伝子異常を検
出し得る。

あるいは、本発明の方法は、倍数性の変化や多様な遺伝子

異常、または生物、器官、組織および細胞中のウイルス、細菌および寄生性病原体を高感度に検出し得、種々の診断に利用し得る。感染したウイルス等の核酸の局在は、蛍光顕微鏡で検出し得、あるいは、FACS(fluorescence activated cell sorter)などにより短時間で感染細胞を測定し得、感染のレベルや検体細胞中に占める感染細胞の割合などを検出し得る。従って、例えば本方法を用いて感染細胞の減少を測定することにより、抗ウイルス剤療法の経過を評価し得る。

本発明によれば、検出可能な標識またはリガンドを含まないプローブを用いて、標的核酸配列が変性しない条件で、ハイブリダイゼーションを行うので、標識またはリガンドによる前記ハイブリダイゼーション反応の妨害がなく、また、1分子あたり、1~6分子の標識またはリガンドを有するRecAタンパク質が、最大約3塩基に1分子程度の割合でプローブに結合し得るので、プローブそのものに直接標識またはリガンドを導入する場合よりも数倍~数100倍の標識またはリガンドをプローブに付加できることになり、標的核酸配列あたり、従来法よりもはるかに強いシグナルが得られる。また、このRecAタンパク質を検出するので、コピー数の少ない標的配列を極めて高感度に特異性高く検出できる。

(以下余白)

実施例

本発明を説明するために以下に実施例を示す。これらの実施例は、本発明の例示であり、本発明を限定するものではない。

5

実施例 1蛍光剤を有するRecAタンパク質の調製

RecAタンパク質として、市販されている大腸菌由来のRecAタンパク質（ファルマシア社製）、または、通常の大腸菌からZarlingらの方法（WO 93/05177）により精製したRecAタンパク質を使用した。使用されたRecAタンパク質の分子量、1本鎖DNA依存ATPase活性、DNase活性、strand transfer能やダブルDループ形成能は、すべて公知の方法（WO 93/05177; Sena, E. P. ら、Nature Genetics、3、365、1993; Shibata, T. ら、Methods in Enzymology、100、197、1983等）であらかじめ測定した。

Cy3TMもしくはCy5TMは、それぞれBIOLOGICAL DETECTION SYSTEMS, INC.社製のFluorolink-AbTM Cy3TM Labeling KitまたはFluorolink-AbTM Cy5TM Labeling Kitを用いてRecAタンパク質に結合させた。

即ち、まず、100μlカップリングバッファー(1M sodium carbonate buffer, pH9.3)の入ったバイアルに、1mlのpH7.2に調整したリン酸緩衝溶液(PBS)に溶解したRecAタンパク質1mgを加えて混合した。この混合液を、Cy3TMまたはCy5TMの入

5 ったバイアル (1mgタンパク質反応用色素、1バイアル)に移して混合し、室温で30分間反応させた。得られた反応液をキットに含まれているゲルfiltrationカラムにアプライし、キットに付属の溶出バッファー (PBS、pH7.2)を用いて溶出することにより、RecAと結合しなかった遊離のCy3TMもしくはCy5TMと、Cy3TMまたはCy5TMと結合したRecAタンパク質を含む画分とを分離した。

10 このようにして得られたCy3TMまたはCy5TMと結合したRecAタンパク質を含む溶液の、波長280nm、552nmまたは652nmにおける吸光度値 A280、A552 (Cy3TMの場合)、またはA652 (Cy5TMの場合)から計算した結果、得られたCy3TMまたはCy5TMを有するRecAタンパク質には、RecAタンパク質モノマーあたり、それぞれCy3TMまたはCy5TMが1~2分子結合していることが判明した (反応に用いるRecAタンパク質の量を、1mgタンパク質反応用色素1バイアルあたり、0.3~2.0mgに変化させることにより、RecAタンパク質モノマーあたりCy3TMまたはCy5TMが1~6分子結合したものを、必要に応じて隨時調製することができる)。

15 FITCは以下のようにしてRecAタンパク質に結合させた。即ち、RecAタンパク質1mgを含む1mlのpH7.2に調整したPBSを、
20 100μlのカップリングバッファーの入ったバイアルに加えて混合した。この混合液を20μgのFITC (RecAタンパク質重量の1/50) の入ったバイアルに移して混合し、室温で20分間反応させた。得られた反応液をセファデックスG-25カラム (ファ

ルマシア製)にアプライし、溶出バッファー(PBS、pH7.2)を用いて溶出することにより、RecAタンパク質と結合しなかった遊離のFITCと、FITCが結合したRecAタンパク質を含む画分とに分離した。得られたFITCが結合したRecAタンパク質を含む溶液の、波長280nmおよび495nmにおける吸光度値A₂₈₀とA₄₉₅から計算して、得られたFITCを有するRecAタンパク質は、RecAタンパク質モノマーあたりFITCが1~2分子結合していることが判明した(反応に用いるFITCの量を、RecAタンパク質1mgあたり、10~80μgに変化させることにより、RecAタンパク質モノマーあたりFITCが1~6分子結合したものを、必要に応じて隨時調製することができる)。

TRITCは上記のFITCと同様の方法でRecAタンパク質に結合させた。即ち、1mgのRecAタンパク質を、40μgのTRITCと反応させてTRITCを有するRecAタンパク質を得た。上記同様TRITCが結合したRecAタンパク質を含む溶液の吸光度値を測定したところ、得られたTRITCを有するRecAタンパク質には、RecAタンパク質モノマーあたりTRITCが1~2分子結合していることが判明した(反応に用いるTRITCの量を、RecAタンパク質1mgあたり、20~200μgに変化させることにより、RecAタンパク質モノマーあたりTRITCが1~6分子結合したものを、必要に応じて随时調製することができる)。

実施例2

蛍光剤を有する抗RecA抗体の調製

抗RecA抗体は、公知の方法、例えば、生物化学実験法15 免疫学実験入門、学会出版センターに記載の方法で調製した。即ち、まず、RecAタンパク質を腹腔内に反復注射したマウス(1回につき100~200μg RecA/1匹)から抗RecA抗体を含む抗血清を得た。得られた抗血清をpH7.2の0.01M PBSに対して一晩透析した。透析した抗血清をDEAE-セルロースカラムにアブライし、pH7.2の0.01M PBSで溶出して抗RecA抗体(IgG分画)を含む溶液を得た。得られた抗RecA抗体を含む溶液を濃縮して約1mg/mlの抗RecA抗体を含む液を得た。この濃縮液に、1/10容量のカップリングバッファーを加えた。得られた溶液に、タンパク質の1/100重量の、FITCをカップリングバッファーに溶解して添加し、7~9°Cで6時間反応させた。得られた反応液を、セファデックスG-25カラム(ファルマシア社製)にアブライし、溶出バッファー(0.01M PBS、pH7.2)を用いて溶出することにより、抗RecA抗体と結合しなかった遊離のFITCと、FITCと結合した抗RecA抗体を含む画分とを分離した。

得られたFITCが結合した抗RecA抗体を含む溶液の、波長280nmおよび495nmにおける吸光度値A280およびA495から計算して、FITCを有する抗RecA抗体は、RecAタンパク質モノマーあたりFITCが3~4分子結合していることが判明した。

上記と同様に、抗RecA抗体量の1/40重量のTRITCを用いて得た、TRITCを有する抗RecA抗体は、RecAタンパク質モノマーあたり、2~3分子のTRITCが結合していることが判明した。

また、実施例1と同様の方法で、BIOLOGICAL DETECTION S

YSYSTEMS, INC. 社製のFluorolink-Ab™ Cy3™ Labeling KitまたはFluorolink-Ab™ Cy5™ Labeling Kitを用いて、Cy3™もしくはCy5™を抗RecA抗体に結合した。上記のように1 mg/mlに調製した抗RecA抗体溶液の1 mlを使用して、得られたCy3™またはCy5™を有する抗RecA抗体は、RecAタンパク質モノマーあたり、Cy3™またはCy5™がそれぞれ4~5分子結合していることが判明した。

実施例 3

10 Cy3™が結合したRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダイゼーション法による1番染色体サテライトIII配列の検出
 (1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

ヒトの1番染色体サテライトIII配列を含むプラスミドpUC 1.77 (Cooke, H. J. ら、 Nucleic Acids Res.、 6、 3177、 1979) を、 bio-14-dATP (Gibco-BRL社製) 存在下で、 BRL社製のニックトランスレーションキットを使用してビオチンラベルすることにより、 1番染色体サテライトIII配列を含むビオチン化DNAプローブを調製した。得られたビオチン化DNAプローブ溶液に1/10量の3 M酢酸ナトリウムを加えた後、 2倍量の冷エタノールを加えてビオチン化DNAプローブを沈殿させて回収した後、 トリス塩酸EDTA緩衝液 (0.1 mM EDTAを含むpH7.5の10 mMトリス塩酸) に懸濁した。

得られた懸濁液を、 滅菌水またはトリス塩酸EDTA緩衝液で希釈し、 0.6 ml容量のマイクロ遠心チューブに入れて沸騰水中

で5分間加熱処理することにより、ビオチン化DNAプローブを変性した。チューブを氷水中に移して急冷した後、1μlの10×RecA反応溶液（20mM酢酸マグネシウム、500mM酢酸ナトリウム、10mMジチオスレイトール、1mM EGTA（エチレングリコール-ビス（β-アミノエチルエーテル）N,N,N',N'-4酢酸）、および50%グリセロールを含むpH7.5の100mMトリス酢酸緩衝液）、1μlのATPγS溶液またはGTPγS溶液（各48.6mM濃度）、4μgのRecAタンパク質、および、2μgの実施例1で得られたCy3TMを有するRecAタンパク質からなる溶液を含む、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに、上記のようにして得た50ngの変性ビオチン化DNAプローブを含む溶液を加え、全量が10μlになるように滅菌水で希釈し、37°Cで15分間反応させた。

その後、ビオチン化DNAプローブと同様に変性して得た40μg/mlのサケ精子DNA溶液の1μlを加え、さらに37°Cで10分間反応させた。得られた反応液に、1μlの100mM酢酸マグネシウム溶液を加えてよく混合し、ハイブリダイゼーション反応溶液を得た。

(2) HEp-2細胞核の調製

ヒト喉頭ガン由来のHEp-2細胞（ATCC CCL23）を、常法により、10%牛胎児血清、ビルビン酸ナトリウム、および抗生物質（ペニシリソ、ストレプトマイシン）を添加したMEM培地（Gibco-BRL社製）で培養した。得られたHEp-2細胞をトリプシン-EDTA処理し、処理された細胞を低速遠心分離で集めて、37°Cの温浴中で75mMのKCl溶液に徐々に懸濁し、経時的に顕微鏡で確

認しながら、5~20分間保温し、適度に核を膨張させた。その後、氷冷したメタノール：酢酸(3:1)混合液を加えて、0~4°Cで遠心分離した。上清を除去してから、さらに氷冷したメタノール：酢酸(3:1)混合液を加えてゆるやかに混合した後遠心分離した。この操作を約8回繰り返すことにより細胞質を除去して核を固定した。

得られた核を、氷冷したメタノール：酢酸(3:1)混合液に再懸濁し、約 $1\sim 2 \times 10^6$ 核/ml濃度の懸濁液を得た。得られた懸濁液を $10\mu l$ ずつスライドガラスに滴下した。滴下した懸濁液を風乾した後、室温~ -80°C で保存した。

(3)未変性の標的核酸配列とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)のように調製したスライドガラス上の標的核酸配列を含む試料に、 $0.5\mu\text{g/ml}$ のprotenaseK溶液(ベーリンガーマンハイム社製、PBSに溶解したもの)100 μl を添加し、この上にパラフィルムを被せて 37°C で3分間処理した。proteinaseK溶液を除去してから、PN(0.5%Nonidet P-40を含むpH8.0の0.1Mリン酸緩衝液)で洗浄した。次に、100 μl の前処理用ブロッキング液(5%スキムミルク、0.1% TritonX-100、0.02%アジ化ナトリウムを含む、pH7.5の10mMトリス酢酸緩衝液)を添加した後、パラフィルムを被せて室温~ 37°C で20~60分間処理することにより試料をブロッキングした。前処理用ブロッキング液を除去した後、pH7.5の10mMトリス酢酸緩衝液で軽く洗浄し、上記(1)で調製した10 μl のハイブリダイゼーション反応

溶液を試料の上に添加した。

次いで、気泡が入らないように注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37°Cのインキュベーター中で2時間反応させた。得られた反応試料を、37°Cに保温した
5 1.75×SSC(20×SSC: 3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム、pH7.5を希釈して調製した)を用いて、10分間ずつ3回洗浄した。次に反応試料を含むスライドガラスをプロッキング液(4×SSC、0.1%TritonX-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸して室温で20分間反応することにより、試料
10 をプロッキングした。次に、5μg/mlのFITCアビジン(Vector社製、DCSグレード、カタログ番号:A-2011、ロット番号:C 0527、F/P値:4.6)を含むプロッキング液(4×SSC、0.1% TritonX-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸し、室温で20分間反応させ、標的核酸配列が結合したプローブ・RecA複合体中に含まれるビオチン化プローブにFITCアビジンを結合させた。その後、スライドガラスを、4×SSC、0.1%TritonX-100を含む4×SSC、および4×SSCの順に室温で各1
15 0分間ずつ洗浄した。

さらに、滅菌水で軽く洗浄した後、抗退色試薬(100mgのp-フェニレンジアミンジヒドロクロリドを10mlのPBSに溶解した後、pH9の0.5Mcarbonate-bicarbonate bufferでpH8に調製し、90mlのグリセロールを加えてから0.22μmのフィルターで滤過した液。必要に応じてプロビディウムイオダイド(PI)や4',6-ジアミディノ-2-フェニルインドール(DAPI)等のカウンター
20

染色剤を添加する)を1滴添加してカバーガラスを被せた。

この試料をまずG励起フィルター(BP-545)と補助励起フィルターE0530を組み合わせたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、Cy3™が結合したRecAタンパク質由来のCy3™のシグナルを検出した。次にIB励起フィルター(BP-495)と補助吸収フィルター(G520)を組み合わせて、標的核酸配列・プローブとの複合体中に含まれるビオチン化プローブ由来のFITCのシグナルを検出した。この結果、Cy3™のシグナルの方がFITCのシグナルより強く、かつCy3™のシグナルとFITCのシグナルが全く同じ位置に重なっていることが判明した。このことから、得られた標的核酸・プローブ複合体中にRecAタンパク質が除去されずにそのまま残っていることが確認できたと同時に、Cy3™が結合したRecAタンパク質を用いて標的核酸・プローブ複合体を2時間以内に効率よく形成させることができ、この標的核酸・プローブ複合体中に含まれるCy3™が結合したRecAタンパク質を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、標的核酸配列である1番染色体サテライトIII配列の存在を、Zarlingらの方法よりもより高感度により簡便にかつ同程度の特異性で検出できることができた。尚、コファクターとしてATPγSを用いた場合も、GTPγSを用いた場合も結果に差はなかった。

実施例4

FITCが結合したRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリ

ダイゼーション法による1番染色体サテライトIII配列の検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

1番染色体サテライトIII配列を含むプラスミドpUC1.77(Cooke, H. J. ら、 Nucleic Acids Res.、 6、 3177、 1979)から、 dNTP(dATP、 dTTP、 dGTP、 dCTP)存在下でBRL社製のニックトランスレーションキットを使用して、 1番染色体サテライトIII配列を含むDNAプローブを調製した。得られたDNAプローブは標識およびリガンドを含んでいない。得られたDNAプローブ溶液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム溶液を添加した後、 2倍量の冷エタノールを加えてDNAプローブを沈殿させて回収し、 0.1 mM EDTAを含むpH7.5の10mMトリス塩酸緩衝液に懸濁した。

この懸濁液を同一組成のトリス塩酸緩衝液または滅菌水で希釈し、 0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに入れて沸騰水中で5分間加熱処理してプローブを変性した後、 チューブを氷水中に移して急冷した。 1μlの10×RecA反応溶液 (20mM酢酸マグネシウム、 500mM酢酸ナトリウム、 10mMジチオスレイトール、 1mM EGTA、 50%グリセロールを含むpH7.5の100mMトリス酢酸緩衝液)、 1μlのATPγS溶液またはGTPγS溶液(48.6mM濃度の保存溶液)(あるいは、 rATP、 dATP、 ATPγSなどとADPの混合物を用いてもよい)、 1.6μgのRecAタンパク質、 および、 実施例1で得られた0.8μgのFITCが結合したRecAタンパク質からなる溶液を含む、 0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに、 上記のようにして得た20ngの変性DNAプローブを含む溶液を加え、 全量が10μlになるように滅菌水で希釈し、 37°Cで15分間反応

させた。

その後、DNAプローブと同様に変性して得た40 μ g/mlのサケ精子DNA溶液の1 μ lを加え、さらに37°Cで10分間反応させた。得られた反応液に、1 μ lの100mM酢酸マグネシウム溶液を加えてよく混合し、ハイブリダイゼーション反応溶液を得た。

5 (2) HEp-2細胞核の調製

実施例3(2)に記載した方法と同様の方法で調製した。

(3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応および検出

10 実施例3(3)に記載した方法と同様の方法で、上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液および上記(2)で調製したスライドガラス上の試料を反応させて、1.75xSSC、0.1% TritonX-100を含む1.75xSSC、1.75xSSCの順で各10分間ずつ37°Cで洗浄した。次に滅菌水で軽く洗浄した後、前記抗退色試薬(PIを含む)を1滴添加して標的核酸配列に結合したプローブ・RecA複合体中のRecAタンパク質に結合したFITCシグナルを、IB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で検出した。

20 この結果より、20ngのプローブとFITCが結合したRecAタンパク質を用いて、2時間以内に標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させることができ、該標的核酸・プローブ複合体中に含まれるFITCを有するRecAタンパク質を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、標的核酸配列の存在を、カウンター染色を施した場合も、

通常の蛍光顕微鏡で容易に検出できることが判明した。これによって本方法を用いることにより、Zarlingらの方法に比べより高感度により簡便に標的核酸配列の存在を検出できることが実証できた。尚、コファクターとしてATP γ Sを用いた場合も、GTP γ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

実施例 5

FITCを有するRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダイゼーション法によるガン抑制遺伝子p53の検出

10 (1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

ガン抑制遺伝子p53のcDNAから調製したONCOR社製のビオチン化プローブ(ONCOR社製、カタログ番号: P1710-B10、ロット番号: 3C114)20ngを使用して、実施例4(1)に記載の方法と同様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

15 (2)HEp-2細胞核の調製

実施例3(2)に記載の方法と同様の方法でHEp-2細胞核を調製した。

(3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応および検出

20 実施例4(3)に記載の方法と同様の方法で、未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応および検出を行った。20ngのp53プローブとFITCを有するRecAタンパク質を用いて、2時間以内に標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させることができ、該標的核酸・プローブ複合体中に含まれるFITC

が結合したRecAタンパク質を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、標的核酸配列（單一コピーであるp53遺伝子配列）の存在を、カウンターチャン色を施した場合も、通常の蛍光顕微鏡で容易に検出できる
5 ことが判明した。

(4) Zarlingらの方法による検出

p53のcDNAから調製した50ngのONCOB社製のビオチン化プローブ、6 μ gのRecAタンパク質、および、20ngのビオチン化プローブ、2.4 μ g RecAタンパク質を使用して、Zarlingらによる
10 WO 93/05177の実施例2に開示される方法に従って、プローブ複合体を調製した。この複合体を、実施例3(2)に記載の方法と同様の方法で調製した試料に添加して、ZarlingらによるW
0 93/05177の実施例3Bに記載の方法と同様の方法で2時間
15 ハイブリダイズし、次いで洗浄を行った。ただし、ハイブリダイゼーション反応の前に10mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)中で60°C、45分間の前処理を行った。前処理用ブロッキング液によるブロッキング処理は行わなかった。

次いで、上記実施例3(3)に記載の方法で、標的核酸配列・プローブ複合体中に含まれるビオチン化プローブにFITCアビジン(Vector社製、DCSグレード、カタログ番号:A-2011、ロット番号:C0527、F/P値:4.6)を結合させ、IB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、ビオチン化プローブ由来のFITCのシグナルを検出した。
20 50ngのビオチン化p53プローブを使用した場合は、カウンタ-

染色しなければ、非常に弱いながらも一応通常の蛍光顕微鏡でシグナルを検出できたが、カウンター染色した場合はビオチン化p53プローブ由来のFITCのシグナルを全く検出できなかった。

5 また20ngのビオチン化p53プローブを使用した場合には、カウンター染色しない場合においてもビオチン化p53プローブ由来のFITCのシグナルを全く検出できなかった。この結果は、本発明による方法が、Zarlingらの方法に比べより高感度により簡便に、單一コピーであるp53遺伝子を検出できることを示す。尚、コファクターとしてATP γ Sを用いた場合も、GTP γ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

実施例 6

15 FITCを有するRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダイゼーション法によるメタノール固定した肝臓ガン由来細胞懸濁液中のHBV核酸配列の検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

全HBV(B型肝炎ウイルス)DNA配列を含むプラスミドpAM6(ATCC 45020)を、dNTP存在下でBRL社製のニックトランスレーションキットを使用して断片化することにより、HBV配列を含むDNAプローブを調製した。このDNAプローブは、検出可能な標識やリガンドを有していない。このようにして調製した20ngのHBVプローブを使用して、実施例4(1)に記載の方法と同様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

(2) 固定した肝臓ガン由来細胞懸濁液の調製

肝臓ガン由来で、HBV核酸配列の一部が染色体に組み込まれていることが知られている“Alexander”細胞(ATCC CRL8024)を、HEp-2細胞と同様にして培養し、遠心分離によって細胞を集めPBSで洗浄した。遠心分離してPBSを除去した後、沈殿した細胞を、100%冷メタノール(または、70%エタノール等の適当な固定液)を加えて固定した。細胞濃度が 2×10^6 個/mlになるように調製して-20°Cで保存した。対照として、HEp-2細胞の懸濁液を同様の方法で固定して調製した。

10 (3) 細胞懸濁液中での未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)で調製した、約 1×10^6 個の細胞を含む細胞懸濁液を、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに分取し、0~4°Cで遠心分離して上清を除去した。沈殿として集められた細胞を風乾した後、 $200 \mu l$ の前処理用ブロッキング液を加えて細胞を懸濁し、室温~37°Cで20~90分間保持することによりブロッキングした。この液を遠心分離して前処理用ブロッキング液を除去し、次いで、pH7.5の10mMトリス酢酸緩衝液で細胞を洗浄した。上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液 $10 \mu l$ を細胞に添加して懸濁した後、37°Cの温浴中で2時間反応させた。

得られた反応液を遠心分離して上清を除去した。次いで、37°Cに保温した $1.75 \times$ SSCを $200 \mu l$ 加えて細胞を懸濁後、37°Cの温浴中で5分間保温し、その後、遠心分離して上清を除去

した。0.1%TritonX-100を含む1.75×SSC、1.75×SSCの順でさらに2回洗浄した。そして30μlの抗退色試薬(PI等のカウンター染色剤は含まない)を加えて細胞を懸濁し、このうち2μlをスライドガラスに滴下し、カバーガラスを被せてIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡でFITCシグナルを観察した。その結果、Alexander細胞からは、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、FITCのシグナルを検出できたが、HEp-2細胞からは全くシグナルは検出されなかった。

この結果から、細胞懸濁液を使用した場合でも、本方法により高感度により簡便に特異性高く標的核酸配列の存在を検出できることが実証された。尚、コファクターとしてATPγSを用いた場合も、GTPγSを用いた場合も結果に差はなかった。

15

実施例7

FITCを有するRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダイゼーション法による中期細胞由来の染色体標本中の1番染色体サテライトIIIDNAの検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

実施例4(1)に記載の方法と同様の方法で調製した。

(2)染色体標本の調製

染色体標本を、例えば、Trask, B. J. ら、Methods in Cell Biology、35、16、1991に記載される常法に従って、健常人の血液から分離したリンパ球を培養してコルセミド処理した後

実施例 3 (2)と同様の方法で固定することによって調製した。

(3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

実施例 4 (3)に記載の方法と同様の方法で行った。20ngのプローブとFITCが結合したRecAタンパク質を用いて、2時間以内に染色体標本中の標的核酸と標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させることができ、FITCを検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、染色体標本中の標的核酸配列である1番染色体サテライトIII配列の存在を、カウンター染色を行った場合も、通常の蛍光顕微鏡で容易に検出できることが判明し、本発明による方法が染色体標本にも適用できることが確認できた。尚、コファクターとしてATP γ Sを用いた場合も、GTP γ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

15

実施例 8

FITCを有する抗RecA抗体を用いる標的核酸配列(1番染色体サテライトIII配列)の検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

検出可能な標識またはリガンドを有しない2.4 μ gのRecAタンパク質を使用して、実施例 4 (1)に記載の方法と同様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

(2)HEp-2細胞核の調製

実施例 3 (2)に記載の方法と同様の方法でHEp-2細胞核を調製した。

(3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)で調製した試料に、 $10\mu l$ の上記(1)で調製したハイ
5 ブリダイゼーション反応溶液を添加した。気泡が入らないよ
うに注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に
入れて 37°C のインキュベーター中で2時間反応させた。この
反応試料を、 37°C に保温した $1.75 \times \text{SSC}$ 中で10分間ずつ3回洗
10 浄した。次に試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4
 $\times \text{SSC}$ 、 0.1% Triton X-100、 5% スキムミルク、 0.02% アジ化
ナトリウム)に浸して室温で20分間反応することにより試料を
ブロッキングした。

ブロッキング液を除去した後、 $100\mu l$ の抗RecA抗体溶液(実
15 施例2で得られた、FITCが結合した抗RecA抗体を $15\mu \text{g}/\text{ml}$ の
濃度でブロッキング液に溶解したもの)を添加し、パラフィル
ムを被せて 37°C で1時間反応させた。この試料を含むスライ
ドガラスを、 $4 \times \text{SSC}$ 、 0.1% Triton X-100を含む $4 \times \text{SSC}$ 、 $4 \times$
20 SSC の順に室温で各10分間ずつ洗浄した。さらに滅菌水で軽く
洗浄した後、上記の抗退色試薬を1滴添加してカバーガラス
を被せてIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス
社製の蛍光顕微鏡で観察し、FITCシグナルを検出することに
より1番染色体サテライトIIIDNAの存在を検出できた。得られ
たシグナルは、実施例4で得られたシグナルよりもさらに強
かった。尚、コファクターとしてATP γ Sを用いた場合もGTP γ
Sを用いた場合も結果に差はなかった。

実施例 9抗RecA抗体を認識し得る2次抗体を用いた標的核酸配列(1番染色体サテライトIII配列)の検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

5 実施例 8 (1)に記載した方法と同様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

(2)HEp-2細胞核の調製

実施例 3 (2)に記載の方法と同様の方法でHEp-2細胞核を調製した。

10 (3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出
上記(2)で調製した試料に、10 μ lの上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液を添加した。気泡が入らないように注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37°Cのインキュベーター中で2時間反応させた。得られた反応試料を、37°Cに保温した1.75×SSC中で10分間ずつ3回洗浄した。次に試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4×SSC、0.1%Triton X-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸して室温で20分間反応させてブロッキングを行った。ブロッキング液を除去した後、100 μ lの抗RecA抗体溶液(実施例2で得られたFITCが結合した抗RecA抗体を15 μ g/mlの濃度でブロッキング液に溶解したもの。FITCが結合していない抗RecA抗体を使用してもよい)を添加し、パラフィルムを被せて37°Cで1時間反応させた。この試料を含むスライドガラスを、4×SSC、0.1%Triton X-100を含む4×SSC、4×

SSCの順に室温で各10分間ずつ洗浄した。さらにもう1度スライドガラスをブロッキング液に浸して室温で20分間反応させて再度ブロッキングを行った。

ブロッキング液を除去した後、100 μ lのFITCが結合したヤギ抗マウスIgG抗体溶液(シグマ社製のヤギ抗マウスIgG抗体を、0.1%Tween-20、2%正常ヤギ血清(Gibco社製)を含むPBSで1/100希釈した溶液)を添加し、パラフィルムを被せて37°Cで1時間反応させた。この試料を含むスライドガラスを、0.1%Tween-20を含むPBSを用いて室温で5分間ずつ3回洗浄した。さらに、滅菌水で軽く洗浄した後、上記の抗退色試薬を1滴添加してカバーガラスを被せてIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、FITCシグナルを検出することにより1番染色体サテライトIII DNAの存在を検出した。

得られたシグナルは、実施例4や8で得られたシグナルよりも強かった。尚、コファクターとしてATP γ Sを用いた場合も、GTP γ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

実施例10

20 ジゴキシゲニンを有するRecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法による多剤耐性(MDR1)遺伝子の検出

(1)ジゴキシゲニンを結合させたRecAタンパク質の調製

ベーリンガーマンハイム社製のDIG抗体ラベリングキットを

用いて、ジゴキシゲニンをRecAタンパク質に結合させた。

即ち、まずRecAタンパク質1mgを1mlのリン酸緩衝溶液(PBS)に溶解し、得られた溶解液に、43.5μlのジゴキシゲニン-3-O-サクシニル-ε-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシ-サクシミドエステル(DIG-NHS)溶液(2μg/μl)を加えて、ゆるやかに攪拌しながら室温で2時間反応させた。ここで、1モルのRecAタンパク質は、5モルのDIG-NHSと反応する。

得られた反応液を、セファデックスG-25にアプライし、溶出緩衝液(PBS、pH7.2)を用いて溶出することにより、RecAと結合しなかった遊離のDIG-NHS、およびDIG-NHSと結合したRecAタンパク質とを分離した。

(2)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

BRL社製のニックトランスレーションキットを使用して、dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)の存在下で、多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列を含むプラスミドpMDRA1(Kioka, Nら、Biochem. Biophys. Res. Commu., 162, 224, 1989)から、多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列を含むDNAプローブを調製した。得られたDNAプローブは、検出可能な標識またはリガンドを含んでいない。得られたDNAプローブを含む溶液に、0.3M酢酸ナトリウムを含むエタノールを添加することにより、DNAプローブを沈殿させて回収した。回収したDNAプローブをトリス塩酸EDTA緩衝液(10mMトリス塩酸、0.1mM EDTA、pH7.5)に懸濁し、Microcon-100(アミコン社製)を用いて精製することにより、DNAプローブ溶液を得た。

得られたDNAプローブ溶液を、滅菌水またはトリス塩酸EDTA緩衝液で希釈し、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに入れた。このチューブを沸騰水中で5分間保持することによりDNAプローブを変性した。変性後、このチューブは氷水中に移して急冷した。

別に、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに、1μlの10×RecA反応溶液(100mMトリス酢酸緩衝液pH7.5、20mM酢酸マグネシウム、500mM酢酸ナトリウム、10mMジチオスレイトール、50%グリセロール)、1μlのATPγS溶液またはGTPγS溶液(4.86mMに調製した保存溶液)、114ngのSSB(single-strand binding protein、ファルマシア社製)、および1.6μgのRecAタンパク質と0.8μgのDIG-NHSとを結合して得たRecAタンパク質を添加し混合した。なお、上記ATPγS溶液またはGTPγS溶液の代わりに、rATP、dATP、またはATPγSとADPの混合物を必要に応じて使用した。

このマイクロ遠心チューブに、上記のようにして変性させたDNAプローブを20ng加え、さらに全量が10μlになるように滅菌水を添加した後、37°Cで15分間反応させた。

得られた反応液に、1μlの酢酸マグネシウム溶液(100 mM)を加えてよく混合することにより、ハイブリダイゼーション反応溶液を得た。

(3) HEp-2細胞核の調製

実施例3(2)に記載した方法と同様の方法で調製した。

(4)未変性の標的配列とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(3)で得たスライドガラス上のHEp-2細胞核に、100 μ lのRNase溶液(ベーリンガーマンハイム社製のRNAaseを、グリセロールを含まない1×RecA反応溶液に、50 μ g/mlの濃度になるように溶解した液)を添加し、パラフィルムを被せて、37°Cで60分間処理した。処理後、RNase溶液を除去し、グリセロールを含まない1×RecA反応溶液で洗浄し、次に室温で10分間、10%のホルマリン溶液(和光純薬社製)で試料を処理した。

次いで、この試料を、グリセロールを含まない1×RecA反応溶液で洗浄し、100 μ lの前処理用ブロッキング液(5%スキムミルク、10mMトリス酢酸緩衝液、0.1% Triton X-100、0.02%アジ化ナトリウム)を添加し、パラフィルムを被せた後、室温～37°Cで20～60分間保持することにより試料をブロッキングした。

次いで、前処理用ブロッキング液を除去し、グルセロールを含まない1×RecA反応溶液を用いて軽く洗浄した後、(2)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液10 μ lを試料の上に添加した。気泡が入らないように注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37°Cのインキュベーター中で2時間保持することによりハイブリダイゼーション反応を行った。得られた反応試料は、37°Cに保温した1.75×SSCを用いて10分間ずつ3回洗浄した。

次に反応試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4×SSC、0.1%Triton X-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸して室温で20分間反応することにより、試料をブ

ロッキングした。次いで、試料を含むスライドガラスを20 μ g/mlの抗ジゴキシゲニン-フルオレッセン(ベーリンガーマンハイム社製)を含むブロッキング液に浸して37°Cで20分間反応させ、標的核酸配列に結合したプローブ・RecA複合体中に含まれるDIG-NHSを結合させたRecAタンパク質に、抗ジゴキシゲニン-フルオレッセンを結合させた。その後、スライドガラスを、4×SSC、0.1%Triton X-100を含む4×SSC、および4×SSCの順に室温で各10分間ずつ洗浄した。次に滅菌水で軽く洗浄した後、実施例3に記載の抗退色試薬を1滴添加してカバーガラスを被せた。この試料をIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、標的核酸(多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列)・プローブ複合体中に含まれるDIG-NHSを結合させたRecAタンパク質由来のフルオレッセン(FITC)のシグナルを検出した。

この結果から、DIG-NHSを結合させたRecAタンパク質を用いても標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させることができ、該標的核酸・プローブ複合体中に含まれるDIG-NHSを結合させたRecAタンパク質を検出することにより、單一コピーである標的配列(多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列)の存在をZarlingらの方法に比べより簡便により高濃度に検出できることを実証できた。

尚、補因子としてATP γ Sを用いた場合も、GTP γ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

請求の範囲

1. 固定された細胞または細胞構造体に含まれる 2 本鎖標的核酸配列の存在を検出する方法であつて、該方法は以下の工程を包含する：細胞または細胞構造体を、核酸プローブが侵入し得るように固定し、固定された細胞または細胞構造体を得る工程；1 本鎖プローブと RecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を形成する工程、ここで、該 1 本鎖プローブは 2 本鎖標的核酸配列に相補的な配列を有する；該プローブ・RecA複合体を、該固定された細胞または細胞構造体に、該 2 本鎖標的核酸配列と接触し得る条件下で添加する工程；該 2 本鎖標的核酸配列が変性しない条件下で、該プローブ・RecA複合体と該 2 本鎖標的核酸配列とを反応させて結合する工程；該 2 本鎖標的核酸配列と結合しなかったプローブ・RecA複合体を除去する工程；および該 2 本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれる RecAタンパク質を検出し、それによって該 2 本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程。
5
- 2: 前記 2 本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、検出可能な標識またはリガンドを有する RecAタンパク質を用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。
10
- 3: 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。
15
- 4: 前記プローブ・RecA複合体を形成する工程が、ATP γ S、
20

GTP γ S、rATP、dATP、ATP γ SとrATPとの混合物、ATP γ SとADPとの混合物、GTP γ SとADPとの混合物、および、GTP γ SとGDPとの混合物からなる群から選択されるコファクターの存在下で行われる、請求項1または2に記載の方法。

5 5. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求
10 項3に記載の方法。

6. 前記標識が蛍光剤であり、前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターにより行われる、請求項2に記載の方法。

7. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは β -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項3に記載の方法。

8. 前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、抗RecA抗体を用いて行われる、請求項1に記載の方法。

9. 前記抗RecA抗体が、検出可能な標識またはリガンドを有する請求項8に記載の方法。

10. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

11. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、

カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、
ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テト
ラメチルローダミンイソチオシアネット、および、7-アミ
ノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択され
5 る、請求項10に記載の方法。

12. 前記標識が蛍光剤であり、前記2本鎖標的核酸配列
の存在を検出する工程が、蛍光顕微鏡またはフローサイトメ
ーターにより行われる、請求項8に記載の方法。

13. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオ
10 キシダーゼまたはβ-ガラクトシダーゼからなる群から選択
される、請求項10に記載の方法。

14. 前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、
抗RecA抗体および抗RecA抗体と結合し得る2次抗体を用いて
行われる、請求項1に記載の方法。

15. 検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパ
ク質を含む、請求項1または2に記載の方法を実施するため
のキット。

16. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、
酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる
20 群から選択される、請求項15に記載のキット。

17. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネット、
カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、
ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テト
ラメチルローダミンイソチオシアネット、および、7-アミノ

-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求項16に記載のキット。

18. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは β -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項16に記載のキット。

19. プローブと検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体を含む、請求項1または2に記載の方法を実施するためのキット。

20. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項19に記載のキット。

21. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求項20に記載のキット。

22. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは β -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項20に記載のキット。

23. RecAタンパク質および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含む、請求項8または9に記載の方法を実施するためのキット。

24. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項23のキット。

25. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求項24に記載のキット。

26. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたはβ-ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項24に記載のキット。

27. プローブとRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体、および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含む、請求項8または9に記載の方法を実施するためのキット。

28. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項27に記載のキット。

29. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求

項 2 8 に記載のキット。

3 0. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは β -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項 2 8 に記載のキット。

5 3 1. 請求項 1 または 2 の方法に使用し得る、標識またはリガンドを有する RecA タンパク質。

3 2. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の RecA タンパク質。

10 3 3. フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される蛍光剤を、RecA タンパク質モノマーあたり 1~6 分子含む、請求項 3 2 に記載の RecA タンパク質。

15 3 4. アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは β -ガラクトシダーゼからなる群から選択される酵素標識を、RecA タンパク質モノマーあたり 1~3 分子含む、請求項 3 2 項に記載の RecA タンパク質。

20 3 5. ビオチン、ジゴキシゲニンの群から選択されるリガンドを、RecA タンパク質モノマーあたり 1~6 分子含む、請求項 3 2 項に記載の RecA タンパク質。

3 6. 前記固定化された細胞または細胞構造体を前処理用

ブロッキング液で処理する工程をさらに包含する、請求項 1
または 2 に記載の方法。

37. 前記ブロッキング液が、カゼイン、スキムミルク、
牛血清アルブミン、前記細胞または細胞構造体に含まれる核
5 酸およびプローブとハイブリダイズしないキャリアーDNA、お
よび、キャリアーRNAからなる群から選択される少なくとも一
種を含む、請求項 36 に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, A, 1-289499 (Aplaid Biosystems, Inc.), November 21, 1989 (21. 11. 89), Official Gazette	
A	Official Gazette of page 7	31-32, 35
	Official Gazette of page 6	33-34
	& EP, B1, 322311	
A	WO, A1, 91/17267 (S.R.I. International), November 14, 1991 (14. 11. 91), & EP, A, 481065 & JP, A, 4-507198 & US, A, 5223414	1 - 37
A	WO, A1, 87/01730 (Earl University), March 26, 1987 (26. 03. 87), & EP, A, 236491	1 - 37
A	US, A, 4888274 (Earl University), December 19, 1989 (19. 12. 89) (Family: none)	1 - 37
A	WO, A1, 93/05177 (Daikin Industries, Ltd.), March 18, 1993 (18. 03. 93),	1 - 37

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
 - "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - "E" earlier document but published on or after the international filing date
 - "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 12, 1995 (12. 04. 95)

Date of mailing of the international search report

May 2, 1995 (02. 05. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02276

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, A, 614492 & JP, A, 6-510200	

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁶ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁶ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, A, 1-289499 (アプライド バイオシステムズ インゴーポレーテッド), 21. 11月. 1989 (21. 11. 89), 公報	31-32, 35
A	公報第7頁 公報第6頁 &EP, B1, 322311	33-34
A	WO, A1, 91/17267 (エス・アール・アイ・インターナショナル),	1-37

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に接続を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 12. 04. 95	国際調査報告の発送日 02.05.95
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 佐伯裕子 ④ 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4 B 9 4 5 3

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/02276

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	14. 11月. 1991(14. 11. 91), &EP, A, 481065 & JP, A, 4-507198 &US, A, 5223414	
A	WO, A1, 87/01730(エール・ユニバーシティ), 26. 3月. 1987(26. 03. 87) &EP, A, 236491	1-37
A	US, A, 4888274(エール・ユニバーシティ), 19. 12月. 1989(19. 12. 89)(ファミリーなし)	1-37
A	WO, A1, 93/05177(ダイキン工業株式会社), 18. 3月. 1993(18. 03. 93) &EP, A, 614492 & JP, A, 6-510200	1-37